



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: Gerald QUAPIL et al.

Appl. No. 09/643,686

Confirmation No. 2565

Filed: August 24, 2000

For: DEVICE FOR ANNALYZING
IMMUNOASSAYS

Art Unit: 1641

Examiner: PADMANABHAN, KARTIC

Atty. Docket No. 31833-150836

Customer No.



26694

PATENT TRADEMARK OFFICE

#2ms
RECEIVED
JUN 05 2003
TECH CENTER 1600/2900

Submission of Certified Copy of Priority Document

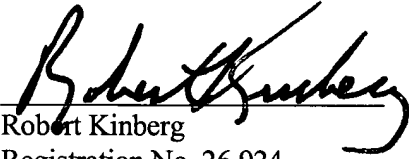
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of Application No. 99116534.1 filed on
August 24, 1999 in Europe, the priority of which is claimed in the present application under the
provisions of 35 U.S.C. 119.

Date: 6/3/03

Respectfully submitted,


Robert Kinberg

Registration No. 26,924

VENABLE

P.O. Box 34385

Washington, D.C. 20043-9998

Telephone: (202) 962-4800

Telefax: (202) 962-8300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Am:



**Europäisches
Patentamt**

**Eur pean
Patent Office**

**Office eur péen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

99116534.1

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

MÜNCHEN, DEN
MUNICH,
MUNICH, LE

08/05/03

THIS PAGE BLANK (USPTO)



**Eur päisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office eur péen
des brevets**

**Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:
Application no.: 99116534: 1
Demande n°:

Anmeldetag:
Date of filing: 24/08/99
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
Leuze electronic GmbH + Co.
73277 Owen/Teck
GERMANY

STIFTUNG FÜR DIAGNOSTISCHE FORSCHUNG
CH-1785 Cressier sur Morat

SWITZERLAND
Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Vorrichtung zur Durchführung von Immunoassays

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:
G01N21/55

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing:
Etats contractants désignés lors du dépôt:

AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

IN DER ANMELDUNG WURDE DER NAME DER ANMELDERIN UNTER 2. FALSCH ANGEBEDEN:
* DIAMED AG, CRESSIER/SUR MORAT -CH
DER RICHTIGE NAME DER ANMELDERIN LAUTET:
* STIFTUNG FÜR DIAGNISTISCHE FORSCHUNG, CRESSIER/SUR MORAT - CH

THIS PAGE BLANK (USPTO)

24. Aug. 1999

Leuze electronic GmbH + Co.

73277 Owen/Teck

- 5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Untersuchung von Immunoassays gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Die medizinische Diagnostik, im speziellen die immunologische Diagnostik, basiert zu einem großen Anteil auf dem ELISA (Enzyme-Linked-
10 Immunosorbent-Assay). Eine neuere Übersicht über Immunoassays findet sich bei Hage, Anal Chem 1999 71, 294R-304R. Zwei Merkmale zeichnen einen ELISA aus: Ein erster Reaktionspartner ist mit einem Enzym markiert und in einem Assay-Medium gelöst. Ein zweiter Reaktionspartner ist an einer Festphase gebunden, wobei die Festphase von einer Grenzfläche eines das Assay-
15 Medium begrenzenden Festkörpers gebildet ist.

Als Festphase kommen dabei meistens standardisierte Kunststoffplatten, häufig Polystyrol, mit 96 Vertiefungen (=Wells) zur Anwendung. Die Oberfläche der Kunststoff Wells bindet Proteine, welche die zweiten Reaktionspartner bilden,
20 im Nanogrammbereich durch Adsorption, was eine für immunologische Nachweise ausreichende Menge ist. Eine Bindungsreaktion mit dem in Lösung vorliegenden enzymmarkierten ersten Reaktionspartner führt zur Bindung des Enzyms an die Festphase. Das gebundene Enzym wird sichtbar gemacht durch die Zugabe eines chromogenen Substrats das spezifisch ist für dieses Enzym. An-
25 schließend kann das entstehende farbige Produkt optisch ausgewertet werden.

Für die Markierung des ersten Reaktionspartners, meistens ein Immunglobulin, mit Enzym gibt es eine Reihe von technischen Möglichkeiten, gängige Markierungen sind Peroxidase oder alkalische Phosphatase.

30

ELISA's ergeben sehr gute Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität, die erreichbaren Nachweisgrenzen liegen im Nanogrammbereich oder darunter.

Es gibt die verschiedensten Ausführungsformen von Assays, die auf diesem Prinzip beruhen. Dabei werden je nach Fragestellung Antigene oder Antikörper nachgewiesen.

- 5 Ein wesentlicher Nachteil des ELISA ist jedoch die Handhabung des Tests, weil nacheinander verschiedene Reagentien zu den Wells zugegeben und wieder entfernt werden müssen. Die Summe der verschiedenen Pipettier-, Wasch-, und Inkubationsschritte variiert von Assay zu Assay und kann zehn oder mehr betragen. Deshalb sind ELISA's zeit- und arbeitsaufwendig in der Durchführung. Um gute Ergebnisse zu erhalten müssen ELISA's von speziell ausgebil-
- 10 detem Personal mit großer Sorgfalt durchgeführt werden.

- Ein weiterer Nachteil des ELISA ist die Zeitdauer für einen Assay, der durch die Summe der Inkubations- und Waschschrte gegeben ist und normalerweise
- 15 eine bis mehrere Stunden dauert.

- Aus der US 3, 939, 350 ist eine Vorrichtung zur Untersuchung von Immuno-Assays bekannt, bei welcher eine transparente Scheibe zwischen ein Prisma und einen Behälter mit dem Assay-Medium einbringbar ist.

- 20 Mittels eines Lasers werden Sendelichtstrahlen im Winkel der Totalreflexion auf die Scheibe geführt, wodurch im Grenzbereich des Assay-Mediums im Bereich der Scheibe ein evaneszentes Feld erzeugt wird.

- 25 Der erste Reaktionspartner in Lösung ist mit einem Fluorophor markiert. Der zweite Reaktionspartner ist an die Oberfläche der Scheibe gebunden. Bindet der Fluorophor markierte Reaktionspartner aus der Lösung an den Reaktionspartner an der Oberfläche, so kann er dann durch das evaneszente Feld eines total reflektierten Lichtstrahls angeregt werden und Fluoreszenzstrahlung emittieren. Diese Fluoreszenzstrahlung wird quantitativ bestimmt und ist direkt
- 30 proportional zu gebundenem Fluorophormarkierten Reaktionspartner und damit

direkt proportional zu der Menge des ursprünglich vorhandenen Reaktionspartners in der Lösung.

5 Da nur der an die Oberfläche gebundene Fluorophor im Evaneszenzfeld des Laserstrahl liegt, wird nur dieser gebundene Fluorophor optimal angeregt und emittiert Photonen. Nicht gebundener Fluorophor in der Lösung ist nicht im Evaneszenzfeld des Lichtstrahls positioniert, wird deshalb nicht angeregt und emittiert auch keine Photonen. Diese Anordnung erlaubt also die quantitative Bestimmung von gebundenem Fluorophor in Anwesenheit von nichtgebundenem Fluorophor.

10 Nachteilig hierbei ist jedoch der mechanisch komplizierte Aufbau der Vorrichtung. Insbesondere das Präparieren der Scheibe und das anschließende Einbringen der Scheibe zwischen Prisma und Behälter ist äußerst zeitaufwendig. 15 Zudem kann die Präparation nur von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde eine Vorrichtung der eingangs genannten Art so auszubilden, dass eine Untersuchung von Immuno-Assays bei 20 hoher Nachweisempfindlichkeit mit geringem Zeit-, Kosten- und Materialaufwand durchführbar ist.

Zur Lösung dieser Aufgabe sind die Merkmale des Anspruchs 1 vorgesehen. Vorteilhafte Ausführungsformen und zweckmäßige Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen beschrieben.

25 Erfindungsgemäß befindet sich das Assay-Medium mit dem ersten und zweiten Reaktionspartner sowie dem Fluorophor in einer Küvette, wobei der zweite Reaktionspartner an der die Grenzfläche bildenden Oberseite des Bodens der 30 Küvette gebunden ist.

Die vom Sender emittierten Sendelichtstrahlen werden über eine Seitenwand des Bodens eingekoppelt, so dass diese im Boden verlaufend im Winkel der Totalreflexion auf die Grenzfläche geführt sind.

- 5 Die lichtumlenkenden und lichtführenden Mittel zur Erzeugung des Evaneszenzfeldes sind somit durch eine geeignete Ausbildung des Bodens der Küvette einfach und kostengünstig herstellbar. Besonders vorteilhaft dabei ist, dass die lichtumlenkenden und lichtführenden Mittel sowie die Aufnahme des Assay-Mediums von einer vorzugsweise einstückig ausgebildeten Küvette gebildet
10 sind.

Zweckmäßigerweise weist die Küvette zudem an ihrem oberen Rand einen Aufsatz auf, mit welchem diese an einer Halterung befestigbar ist.

- 15 Die Untersuchung von Immunoassays kann somit in einer geringen Anzahl von Arbeitsschritten durchgeführt werden. Insbesondere ist nahezu kein Aufwand für die Präparation der Assays nötig.

- Weiterhin ist vorteilhaft, dass die erfindungsgemäße Vorrichtung wenig Einzelteile umfasst, einen geringen Montageaufwand erfordert und zudem klein
20 von den Abmessungen ist und ein geringes Gewicht aufweist, so dass diese einfach handhabbar und insbesondere auch mobil ausgebildet sein kann.

- In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform kann auch eine Mehrfachanordnung von Küvetten vorgesehen sein, wobei diese stationär angeordnet
25 sind und mittels einer Mehrfachanordnung von Sendern untersuchbar sind, wobei die von den einzelnen Küvetten ausgehenden Fluoreszenzstrahlen von einem gemeinsamen Empfänger (10) registriert werden

- 30 Diese Anordnung ist einfach und kostengünstig herstellbar. Zudem ist vorteilhaft, dass bei dieser keine bewegten Teile benötigt werden, wodurch der Justageaufwand gering gehalten wird.

Die Erfindung wird im nachstehenden anhand der Zeichnungen erläutert. Es zeigen

- 5 Figur 1: Schematische Darstellung eines ersten Ausführungsbeispiels einer Vorrichtung zur Untersuchung von Immunoassays mit einer Küvette zur Aufnahme eines Assay-Mediums.

Figur 2: Querschnitt durch die Küvette gemäß Figur 1.

10

Figur 3: Draufsicht auf die Küvette gemäß Figur 1

Figur 4: Teildarstellung eines zweiten Ausführungsbeispiels zur Untersuchung von Immunoassays.

15

Figur 5: Schematische Darstellung eines dritten Ausführungsbeispiels zur Untersuchung von Immunoassays mit einer ersten Mehrfachanordnung von Küvetten.

20

Figur 6: Querschnitt durch einen Teil der Vorrichtung gemäß Figur 5.

Figur 7: Schematische Darstellung eines dritten Ausführungsbeispiels zur Untersuchung von Immunoassays mit einer zweiten Mehrfachanordnung von Küvetten.

25

Figur 8: Querschnitt durch die Vorrichtung gemäß Figur 7.

Figur 1 zeigt ein erstes Ausführungsbeispiel einer Vorrichtung 1 zur Untersuchung von Immunoassays.

30

Das zu untersuchende Immunoassay befindet sich in einer Küvette 2. Zur Untersuchung des Assays ist eine optische Sensoranordnung vorgesehen. Die Sen-

soranordnung umfasst einen Sendelichtstrahlen 3 emittierenden Sender 4, der von einem Laser gebildet ist. Dem Sender 4 ist ein Polarisationsfilter 5 nachgeordnet, so dass die auf die Küvette 2 gerichteten Sendelichtstrahlen 3 linear polarisiert sind.

5

Der Sender 4 ist vor einer abgeschrägten Seitenwand 6 des Bodens der Küvette 2 angeordnet. Die Neigung dieser Seitenwand 6 ist so gewählt, dass die dort auftreffenden Sendelichtstrahlen 3 an der Seitenwand 6 durch Brechung auf die Oberseite des Bodens der Küvette 2 hin gebrochen werden und dort im Winkel der Totalreflexion auftreffen. Die Neigung der Seitenwand 6 ist zudem so gewählt, dass die Sendelichtstrahlen 3 im Brewster-Winkel auftreffen. Dadurch bleibt die Polarisierung der Sendelichtstrahlen 3 bei Eintritt in die Küvette 2 erhalten. Zudem entstehen keine Intensitätsverluste. Die Oberseite des Bodens der Küvette 2 bildet eine Grenzfläche 7 zum Immunoassay. Dadurch wird nahezu die gesamte Lichtmenge der Sendelichtstrahlen 3 an der Oberseite des Bodens reflektiert und auf eine zweite Seitenwand 6¹ des Bodens der Küvette 2 geführt. An dieser Seitenwand 6¹ werden die Sendelichtstrahlen 3 nochmals gebrochen und treffen auf einen optischen Sumpf 8, der eine Rückreflexion der Sendelichtstrahlen 3 auf die Küvette 2 vermeidet. Die Strahlführung der Sendelichtstrahlen 3 ist so gewählt, dass diese außerhalb der Küvette 2 in horizontaler Richtung und parallel zur Oberseite des Bodens der Küvette 2 verlaufen.

10

15

20

25

Trotz der Totalreflexion der Sendelichtstrahlen 3 an der Grenzfläche 7 dringt ein exponentiell mit der Distanz zur Grenzfläche 7 abfallender kleiner Teil der Lichtmenge der Sendelichtstrahlen 3 in das Innere der Küvette 2 ein und bildet dort innerhalb einer Grenzsicht ein evaneszentes Feld. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ist dabei größer als die Rauhtiefe der Oberfläche der Küvette 2.

30

In der Küvette 2 befinden sich unter anderem Fluorophore. Die Fluorophore werden in der Grenzsicht optisch angeregt und emittieren Fluoreszenzstrahlen 9. Der den Boden der Küvette 2 durchsetzende Teil der Fluoreszenzstrahlen

len 9 trifft auf einen Empfänger 10, der in Abstand unterhalb der Küvette 2 angeordnet ist. Der Empfänger 10 ist von einem PIN-Detektor, einem Photomultiplier oder einer Avalanche-Diode gebildet.

- 5 Zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit sind dem Empfänger 10 ein Polarisationsfilter 11, eine Empfangsoptik 12 in Form einer Sammellinse und ein Interferenzfilter 13 vorgeordnet.

10 Der Empfänger 10 und der Sender 4 sind an eine gemeinsame, nicht dargestellte Auswerteeinheit angeschlossen, die von einem Microcontroller oder dergleichen gebildet ist. In der Auswerteeinheit erfolgt die Auswertung der am Ausgang des Empfängers 10 anstehenden Empfangssignale. Zudem erfolgt die Steuerung des Senders 4 über die Auswerteeinheit.

- 15 In der Küvette 2 befindet sich ein Assay-Medium, das typischerweise von einer wässrigen Lösung gebildet ist. In dem Assay-Medium befindet sich ein erster Reaktionspartner, der mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 quantitativ nachgewiesen wird. Typischerweise ist der erste Reaktionspartner von Antigenen oder Antikörpern gebildet. Ein zweiter Reaktionspartner, der beispielsweise von einem Protein gebildet ist, ist an der Grenzfläche 7 der Küvette 2 durch Adsorption gebunden.
- 20

Der erste Reaktionspartner in Lösung ist mit dem Fluorophor markiert. Der zweite Reaktionspartner ist an die Grenzfläche 7 der Küvette 2 gebunden. Bindet der Fluorophor markierte erste Reaktionspartner aus der Lösung an den zweiten Reaktionspartner an der Oberfläche, so kann er dann durch das evaneszente Feld der totalreflektierten Sendelichtstrahlen 3 angeregt werden und Fluoreszenzstrahlen 9 emittieren. Diese Fluoreszenzstrahlen 9 werden im Empfänger 10 quantitativ bestimmt und sind direkt proportional zu dem gebundenen fluorophormarkierten Reaktionspartner und damit direkt proportional zu der Menge des ursprünglich vorhandenen ersten Reaktionspartners in der Lösung.

25

30

Da nur der an die Oberfläche gebundene Fluorophor im Evaneszenzfeld der Sendelichtstrahlen 3 liegt, wird nur dieser gebundene Fluorophor angeregt und emittiert Fluoreszenzstrahlen 9. Nicht gebundener Fluorophor in der Lösung ist nicht im Evaneszenzfeld positioniert, wird deshalb nicht angeregt und emittiert auch keine Fluoreszenzstrahlen 9. Diese Anordnung erlaubt somit die quantitative Bestimmung von gebundenem Fluorophor in Anwesenheit von nichtgebundenem Fluorophor ohne einen vorhergehenden Separations- und Waschschr

10 Dabei wird zweckmäßigerweise nach Zugabe des ersten Reaktionspartners in die Küvette 2 die Zunahme des gebundenen Fluorophors mit zeitlich fortschreitender Reaktion direkt gemessen. Da die Menge gebundenen Fluorophors direkt proportional zur ursprünglich vorhandenen Menge Fluorophors ist, ermöglicht die Sensoranordnung die quantitative Bestimmung von in der Lösung befindlichem Reaktanten in Echtzeit ohne zusätzliche weitere Wasch- und/oder Pipettierschritte außer dem ersten Pipettierschritte.

Da die Absorptionskoeffizienten und Emissionseigenschaften für Fluorophore sehr günstig sind, ergeben sich geringe Nachweisgrenzen. Bereits nach einigen Minuten können Reaktionen gemessen und quantifiziert werden.

Bei der Auswertung der am Ausgang des Empfängers 10 anstehenden Empfangssignale wird vor Untersuchung des Immunoassays zunächst das Dunkelrauschen des Empfängers 10 und der in diesem integrierten Photonenzähleinheit emittiert. Dabei wird als Standardabweichung für das Dunkelrauschen die Quadratwurzel \sqrt{N} der registrierten Rate N der Photonen ermittelt.

Zum quantitativen Nachweis des ersten Reaktionspartners in der Küvette 2 muß dann das bei der Untersuchung des Immunoassays ansteigende Empfangssignal innerhalb einer bestimmten Messzeit ein Vielfaches dieser Standardabweichung erreichen. Gleichzeitig muss die Form des Anstiegs des Empfangssignals einer Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstante innerhalb vorgege-

bener Toleranzgrenzen genügen. Die mathematisch angepassten Werte für die Zeitkonstante, die Amplitude und den Offset des Empfangssignals müssen innerhalb vorgegebener Grenzen liegen.

- 5 Schließlich darf die Summe der Abweichungen von Messwerten und der an diese angepassten mathematischen Kurve einen bestimmten Wert nicht überschreiten.

- 10 Entsprechend dem sich ändernden Inhalt der Küvette 2 können die vorgenannten Parameter variiert werden.

Der Aufbau der Küvette 2 ist aus Figur 1 sowie insbesondere aus den Figuren 2 und 3 ersichtlich. Die Küvette 2 weist im wesentlichen einen hohlzylindrischen Grundkörper auf und ist zur Oberseite hin offen.

15

- Der Boden der Küvette 2 besteht aus einem massiven kreiszylindrischen Grundkörper, wobei die Mantelfläche an gegenüberliegender Seite abgeschrägt ist. Die dadurch entstehenden Seitenwände 6, 6¹ laufen in schrägem Winkel auf die ebene Unterseite des Bodens zu. Die ebenen Seitenwände 6, 6¹ sind spiegelsymmetrisch zum Grundkörper der Küvette 2 angeordnet. Die Neigungswinkel der Oberflächen der Seitenwände 6, 6¹ der Küvette 2 sind so angepasst, dass entsprechend des Berechnungsindex des Küvettenmaterials und des in der Küvette 2 enthaltenen Assay-Mediums die wie in Figur 1 dargestellten, horizontal verlaufenden und auf eine Seitenwand 6 der Küvette 2 auftreffenden
20 Sendelichtstrahlen 3 im Winkel der Totalreflexion in Richtung der Oberseite des Bodens der Küvette 2 abgelenkt werden, welche die Grenzfläche 7 bildet. Entsprechend werden dann die Sendelichtstrahlen 3 über die zweite Seitenwand 6¹ aus der Küvette 2 ausgekoppelt.
25

- 30 Die Küvette 2 weist einen Aufsatz 14 auf, der an den oberen Rand des hohlzylindrischen Grundkörpers anschließt. Der Aufsatz 14 ist scheibenförmig ausgebildet und weist im wesentlichen die Form einer Platte mit rechteckigem Quer-

schnitt auf. Die Küvette 2 wird zur Fixierung relativ zur Sensoranordnung am Aufsatz 14 an einer nicht dargestellten Halterung befestigt. Vorzugsweise ist die Küvette 2 an gegenüberliegenden seitlichen Rändern des Aufsatzes 14 gehalten. Die seitlichen Ränder oder die Oberseite des Aufsatzes 14 können zudem Markierungen zur Identifikation des Inhalts der Küvette 2 tragen. Die Markierungen können insbesondere von Barcodes gebildet sein.

Die Küvette 2 bestehend aus Grundkörper und Aufsatz 14 ist einstückig ausgebildet und besteht vorzugsweise aus einem Kunststoffspritzteil. Die Küvette 2 besteht dabei vorzugsweise aus Polystyrol.

Die offene Oberseite der Küvette 2 kann mit einer Folie oder dergleichen abgeschlossen werden. Dann kann beispielsweise mit einer Spritze durch die Folie das zu untersuchende Immunoassay in die Küvette 2 eingespritzt werden.

Bei der Anordnung gemäß Figur 1 werden die vom Sender 4 emittierten Sendelichtstrahlen 3 in die Küvette 2 eingekoppelt, dann nach einmaliger Totalreflexion an der Grenzfläche 7 der Küvette 2 aus dieser ausgekoppelt und schließlich dem optischen Sumpf 8 zugeführt. Nachteilig hierbei ist, dass aufgrund des kleinen Durchmessers der Sendelichtstrahlen 3, der typischerweise erheblich kleiner als die Größe der Grenzfläche 7 ist, nur ein kleiner Teil der in der Grenzschicht befindlichen Fluorophore optisch angeregt wird.

Um diesen Nachteil zu beheben kann die Anordnung gemäß Figur 4 vorgesehen werden. Bei dieser Anordnung werden die Sendelichtstrahlen 3 nach dem ersten Durchgang durch die Küvette 2 an einem ersten Spiegel 15 mit vorgeordnetem Polarisationsfilter 16 reflektiert und über die zweite Seitenwand 6¹ des Bodens wieder in die Küvette 2 so eingekoppelt, dass die Sendelichtstrahlen 3 im Winkel der Totalreflexion nochmals an der Grenzfläche 7 reflektiert werden. Die nach der Reflexion aus der Küvette 2 austretenden Sendelichtstrahlen 3 treffen dann auf einen zweiten Spiegel 17 mit vorgeordnetem Polarisationsfilter 18 und werden nochmals in die Küvette 2 eingekoppelt. Nach To-

talreflexion an der Grenzfläche 7 treffen die Sendelichtstrahlen 3 nochmals auf den ersten Spiegel 15. Von dort werden die Sendelichtstrahlen 3 nochmals in die Küvette 2 eingekoppelt und treffen nach Totalreflexion an der Grenzfläche 7 auf den optischen Sumpf 8. Der Sender 4, die Spiegel 15, 17 sowie der optische Sumpf 8 sind im wesentlichen in einer Ebene, die durch den Küvettenboden verläuft, seitlich versetzt zueinander angeordnet, so dass bei den einzelnen Durchgängen durch die Küvette 2 die Sendelichtstrahlen 3 jeweils an unterschiedlichen Stellen auf die Grenzfläche 7 auftreffen. Dadurch wird ein erheblicher Teil der Grenzfläche 7 mittels der Sendelichtstrahlen 3 optisch angeregt.

10

In den Figuren 5 und 6 ist eine Vorrichtung 1 mit einer Mehrfachanordnung von Küvetten 2 dargestellt. Dabei sind die Küvetten 2 in einer Linearanordnung hintereinander angeordnet und in einem Rahmen 19 gelagert, der die Halterung bildet. Jeder Küvette 2 ist jeweils ein Sender 4 und ein optischer Sumpf 8 zugeordnet.

15

Die an der Unterseite der Böden der Küvette 2 austretenden Fluoreszenzstrahlen 9 werden über die Empfangsoptik 12 zum Empfänger 10 geführt, wobei dem Empfänger 10 analog zu Figur 1 ein Interferenzfilter 13 und ein Polarisationsfilter 11 vorgeordnet sind, welche in den Figuren 5 und 6 der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt sind.

20

Unterhalb jeder Küvette 2 ist eine Linse 20 und ein dieser nachgeordneter Umlenkspiegel 21 angeordnet. Mittels der Linse 20 werden die aus der Küvette 2 austretenden Sendelichtstrahlen 3 gesammelt und zum Umlenkspiegel 21 geführt. Die den einzelnen Küvetten 2 zugeordneten Umlenkspiegel 21 sind so orientiert, dass die daran reflektierten Fluoreszenzstrahlen 9 über die Empfangsoptik 12 auf den Empfänger 10 treffen. Der Übersichtlichkeit wegen sind nur die von drei Küvetten 2 ausgehenden Fluoreszenzstrahlen 9 in Figur 5 aufgetragen. Die von den restlichen Küvetten 2 ausgehenden Fluoreszenzstrahlen 9 sind dagegen nicht eingezeichnet.

30

Damit die aus den einzelnen Küvetten 2 austretenden Fluoreszenzstrahlen 9 separat ausgewertet werden können, werden über die Auswerteeinheit die Sender 4 einzeln nacheinander aktiviert.

5 In den Figuren 7 und 8 ist eine Vorrichtung 1 mit einer weiteren Mehrfachanordnung von Küvetten 2 dargestellt. Figur 7 zeigt eine konzentrische Anordnung von Küvetten 2, wobei im Zentrum der Anordnung ein stationärer Polygonspiegel 22 angeordnet ist. Jeder Küvette 2 ist wiederum ein Sender 4 und ein optischer Sumpf 8 zugeordnet, die in den Figuren 7 und 8 nicht dargestellt sind. Die Küvetten 2 sind in einer nicht dargestellten Halterung gelagert.
10 Die Sender 4 und die optischen Sümpfe 8 sind ebenfalls stationär in vorgegebenen Positionen zur jeweiligen Küvette 2 angeordnet.

Wie insbesondere aus Figur 8 ersichtlich ist, sind die Küvetten 2 in einer Ebene
15 liegend angeordnet, während sich der Polygonspiegel 22 unterhalb der Küvetten 2 befindet.

Jeder Küvette 2 ist eine Linse 23 und ein Umlenkspiegel 24 zugeordnet, welche unterhalb des Bodens der jeweiligen Küvette 2 angeordnet sind. Die an der
20 Unterseite des Bodens einer jeden Küvette 2 austretenden Fluoreszenzstrahlen 9 werden mittels der Linse 23 gesammelt und auf den Umlenkspiegel 24 geführt. Die dort reflektierten Fluoreszenzstrahlen 9 werden am Polygonspiegel 22 abgelenkt und zu dem unterhalb des Polygonspiegels 22 angeordneten Empfänger 10 geführt. Die dem Empfänger 10 vorgeordnete Empfangsoptik 12
25 sowie der Polarisationsfilter 11 und Interferenzfilter 13 sind in Figur 8 nicht dargestellt.

Damit die aus den einzelnen Küvetten 2 austretenden Fluoreszenzstrahlen 9 separat ausgewertet werden können, werden die Sender 4 wiederum einzeln
30 nacheinander aktiviert.

Patentansprüche

5

1. Vorrichtung zur Untersuchung von Immunoassays mit einem flüssigen Assay-Medium, welches von wenigstens einer Grenzfläche eines Festkörpers begrenzt ist, wobei ein erster Reaktionspartner in dem Assay-Medium gelöst und mit einem Fluorophor markiert ist, und ein zweiter Reaktionspartner innerhalb einer Grenzschicht des Assay-Mediums an der Grenzfläche gebunden ist, und wobei zum quantitativen Nachweis des ersten Reaktionspartners mittels eines Sendelichtstrahlen emittierenden Senders in der Grenzschicht ein Evaneszenzfeld generiert wird, durch welches an die zweiten Reaktionspartner gebundene fluorophor-markierte erste Reaktionspartner optisch angeregt werden und Fluoreszenzstrahlen emittieren, welche in einem Empfänger nachgewiesen werden, dadurch gekennzeichnet, dass die Grenzfläche (7) von der Oberseite des Bodens einer den Festkörper bildenden Küvette (2) zur Aufnahme des Assay-Mediums gebildet ist, und dass die Sendelichtstrahlen (3) über eine Seitenwand (6) des Bodens eingekoppelt sind, so dass diese im Boden verlaufend im Winkel der Totalreflexion auf die Grenzfläche (7) geführt sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Boden der Küvette (2) zwei gegenüberliegende, in einem Winkel kleiner als 90° zur Grenzfläche (7) verlaufende ebene Seitenwände (6, 6¹) aufweist, wobei die Sendelichtstrahlen (3) über eine erste Seitenwand (6) in den Boden eingekoppelt und nach Totalreflexion an der Grenzfläche (7) über die zweite Seitenwand (6¹) ausgekoppelt sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Seitenwände (6, 6¹) des Bodens der Küvette (2) symmetrisch zu deren Symmetrieebene verlaufen.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Küvette (2) eine im wesentlichen hohlzylindrische Form aufweist, wobei die ebenen Seitenwände (6, 6¹) als Abschrägungen des kreiszylindrischen Bodens der Küvette (2) ausgebildet sind.
- 5 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Küvette (2) an ihrer Oberseite offen ist und einen an ihrem oberen Rand anschließenden scheibenförmigen Aufsatz (14) aufweist, der in eine Halterung einsetzbar ist.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Aufsatz
10 (14) einen rechteckigen Querschnitt aufweist, an dessen Längsseiten die Halterung befestigbar ist.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass an einem seitlichen Rand des Aufsatzes (14) eine Markierung zur Kennzeichnung des Inhalts der Küvette (2) vorgesehen ist.
- 15 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Küvette (2) einstückig ausgebildet ist.
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Küvette (2) aus einem Kunststoffspritzteil besteht.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Küvette
20 (2) aus Polystyrol besteht.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Sendelichtstrahlen (3) ausserhalb der Küvette (2) parallel zur Grenzfläche (7) der Küvette (2) verlaufen.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 11, dadurch gekennzeichnet, dass
25 die Fluoreszenzstrahlen (9) über die Unterseite des Bodens der Küvette (2) ausgekoppelt und auf den Empfänger (10) geführt sind.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Sender (4) vor einer Seitenwand (6) des Bodens der Küvette (2) angeordnet ist, und dass die Sendelichtstrahlen (3) nach Austritt aus der Küvette (2) auf einen optischen Sumpf (8) geführt sind.
- 5 14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Sender (4) von einem Laser gebildet ist, welchem ein Polarisationsfilter (5) nachgeordnet ist
- 15 15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass mittels einer Anordnung von Spiegeln (15, 17) mit vorgeordneten Polarisationsfiltern (16, 18) die Sendelichtstrahlen (3) mehrfach
10 durch den Boden der Küvette (2) zur Grenzfläche (7) geführt sind.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Empfänger (10) von einem Photomultiplier, einem PIN-Detektor oder einer Avalanche-Diode gebildet ist, welchem ein Polarisationsfilter
15 (11), eine Empfangsoptik (12) und ein Interferenzfilter (13) vorgeordnet sind.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 16, dadurch gekennzeichnet, dass diese eine Mehrfachanordnung von Küvetten (2) aufweist, auf welche jeweils von einem Sender (4) emittierte Sendelichtstrahlen (3) ge-
20 richtet sind, und dass die aus den einzelnen Küvetten (2) austretenden Fluoreszenzstrahlen (9) in einem gemeinsamen Empfänger (10) registriert werden.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Sender (4) einzeln nacheinander aktiviert werden.
- 25 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass eine Linearanordnung von Küvetten (2) vorgesehen ist.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Küvetten (2) der Mehrfachanordnung konzentrisch zu

einem Polygonspiegel (22) angeordnet sind, wobei die an den Küvetten (2) austretenden Fluoreszenzstrahlen (9) über den Polygonspiegel (22) zum Empfänger (10) geführt sind.

Leuze electronic GmbH + Co.

73277 Owen/Teck

- 5 Bezugszeichenliste
- (1) Vorrichtung
- (2) Küvette
- (3) Sendelichtstrahlen
- 10 (4) Sender
- (5) Polarisationsfilter
- (6) Seitenwand
- (6¹) Seitenwand
- (7) Grenzfläche
- 15 (8) optischer Sumpf
- (9) Fluoreszenzstrahlen
- (10) Empfänger
- (11) Polarisationsfilter
- (12) Empfangsoptik
- 20 (13) Interferenzfilter
- (14) Aufsatz
- (15) Spiegel
- (16) Polarisationsfilter
- (17) Spiegel
- 25 (18) Polarisationsfilter
- (19) Rahmen
- (20) Linse
- (21) Umlenkspiegel
- (22) Polygonspiegel
- 30 (23) Linse
- (24) Umlenkspiegel

THIS PAGE BLANK (USPTO)

24. Aug. 1999

Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung (1) zur Untersuchung von Immunoassays mit einem flüssigen Assay-Medium, welches von wenigstens einer Grenzfläche (7) eines Festkörpers begrenzt ist, wobei ein erster Reaktionspartner in dem Assay-Medium gelöst und mit einem Fluorophor markiert ist, und ein
10 zweiter Reaktionspartner innerhalb einer Grenzschicht des Assay-Mediums an der Grenzfläche (7) gebunden ist. Zum quantitativen Nachweis des ersten Reaktionspartners wird mittels eines Sendelichtstrahlen (3) emittierenden Senders (4) in der Grenzschicht ein Evaneszenzfeld generiert wird, durch welches an die zweiten Reaktionspartner gebundene fluorophormarkierten ersten Reaktionspartner optisch angeregt werden und Fluoreszenzstrahlen (9) emittieren,
15 welche in einem Empfänger (10) nachgewiesen werden. Die Grenzfläche (7) ist von der Oberseite des Bodens einer den Festkörper bildenden Küvette (2) zur Aufnahme des Assay-Mediums gebildet. Die Sendelichtstrahlen (3) sind über eine Seitenwand (6) des Bodens eingekoppelt, so dass diese im Boden verlaufend im Winkel der Totalreflexion auf die Grenzfläche (7) geführt sind.
20

Figur 1

Fig.1

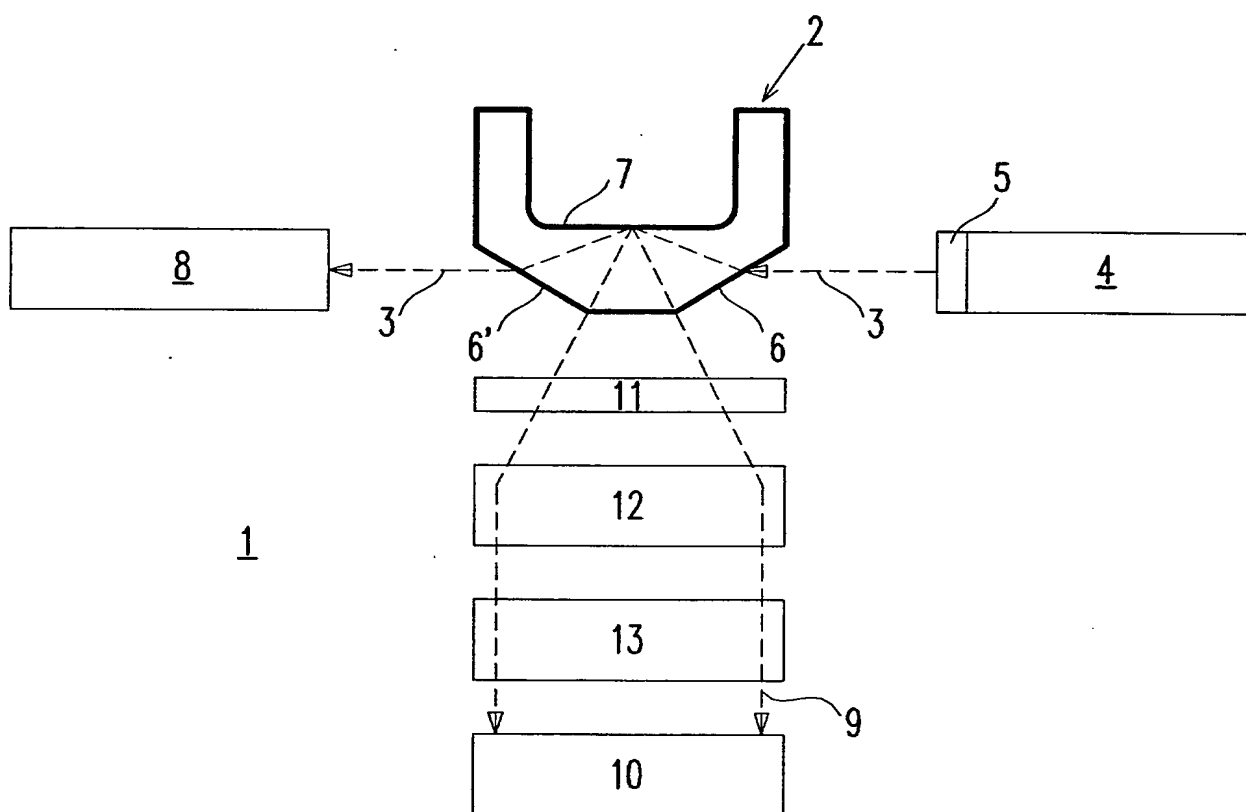


Fig.1

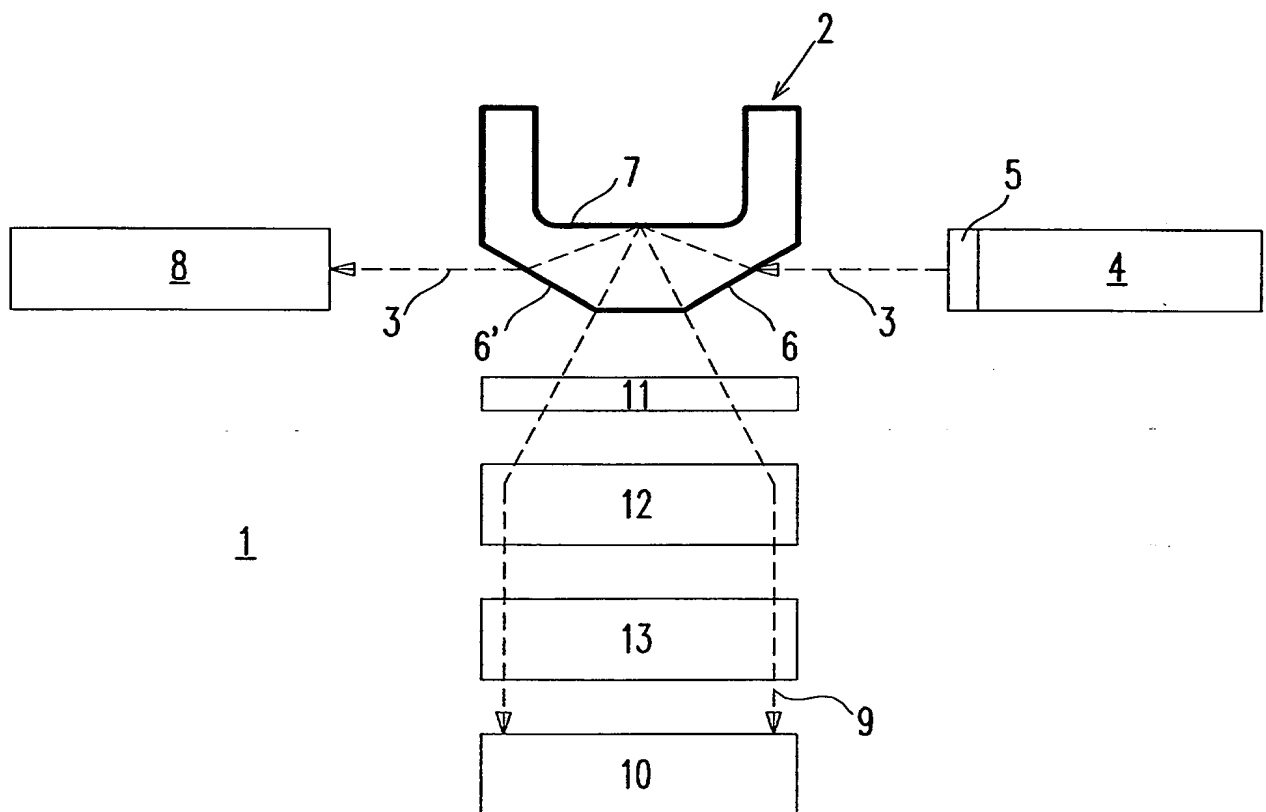


Fig.2

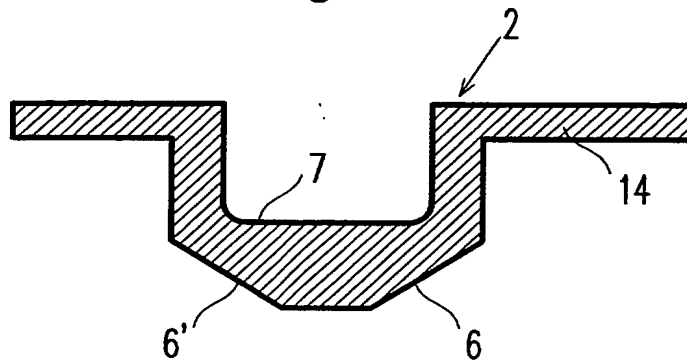


Fig.3

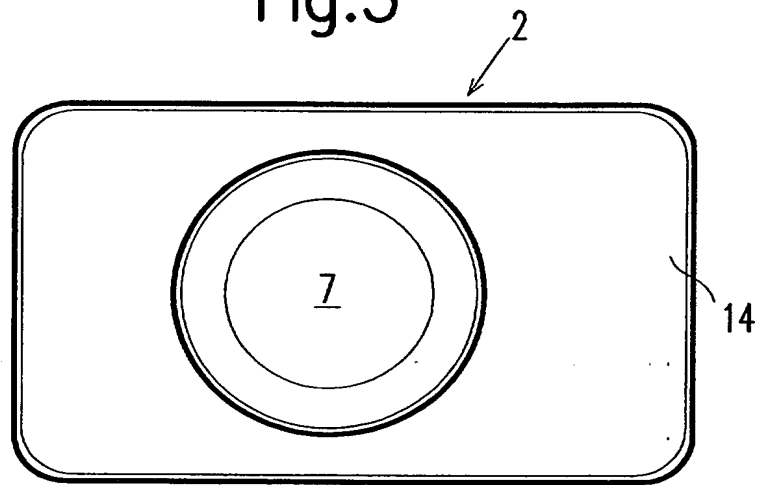


Fig.4

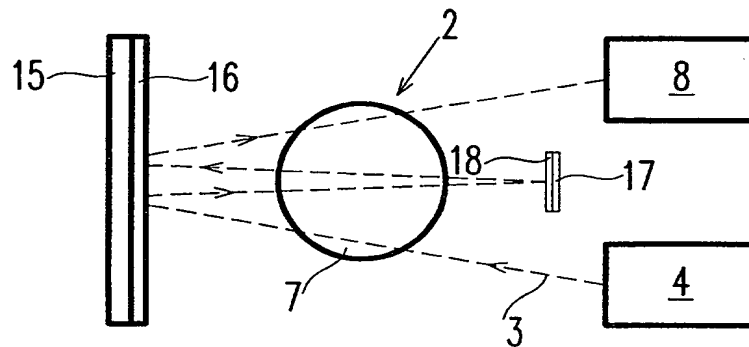


Fig.5

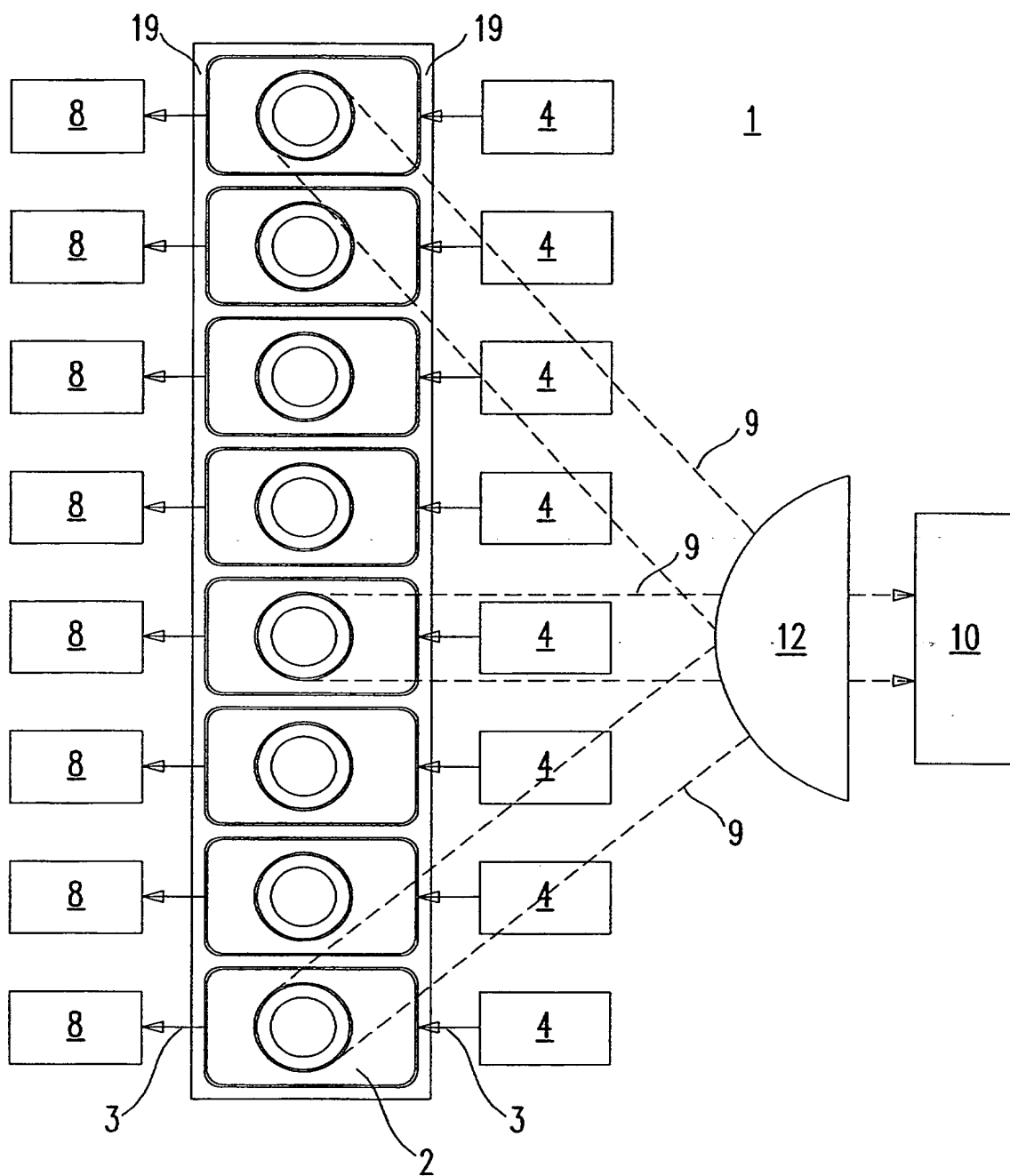


Fig.6

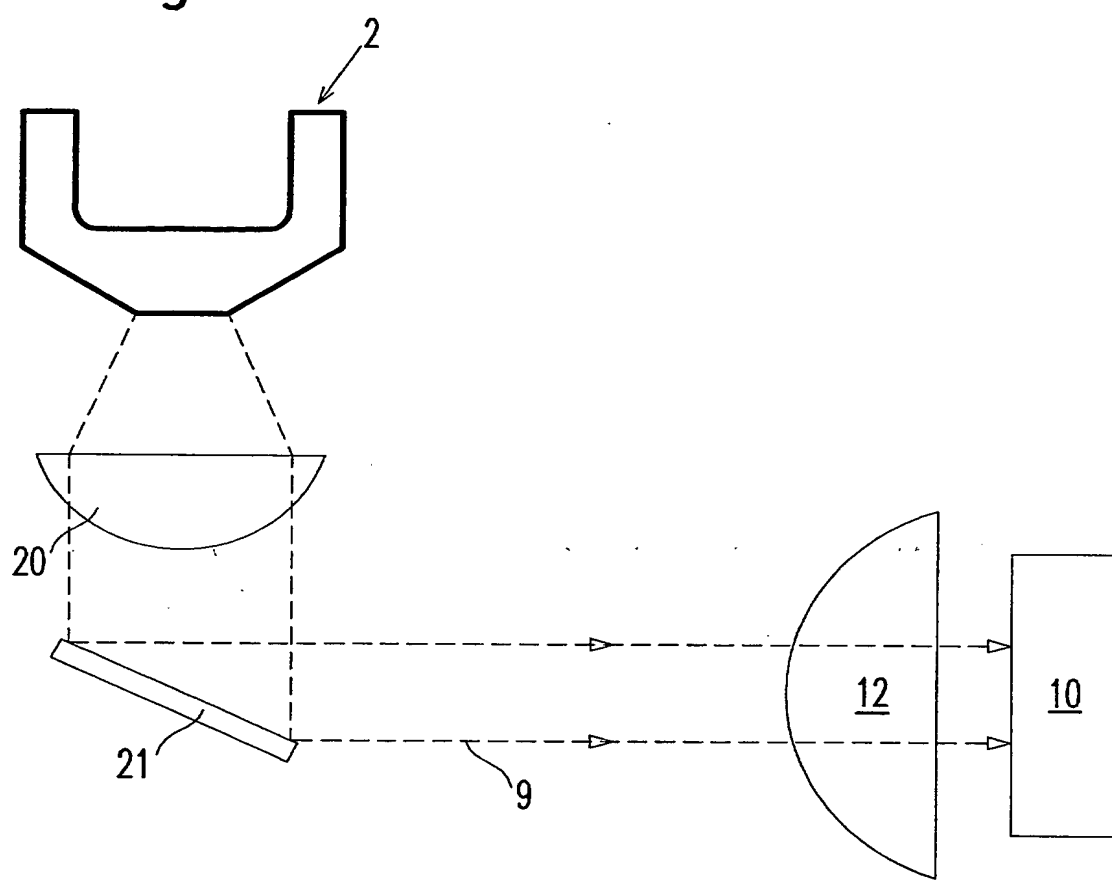


Fig.7

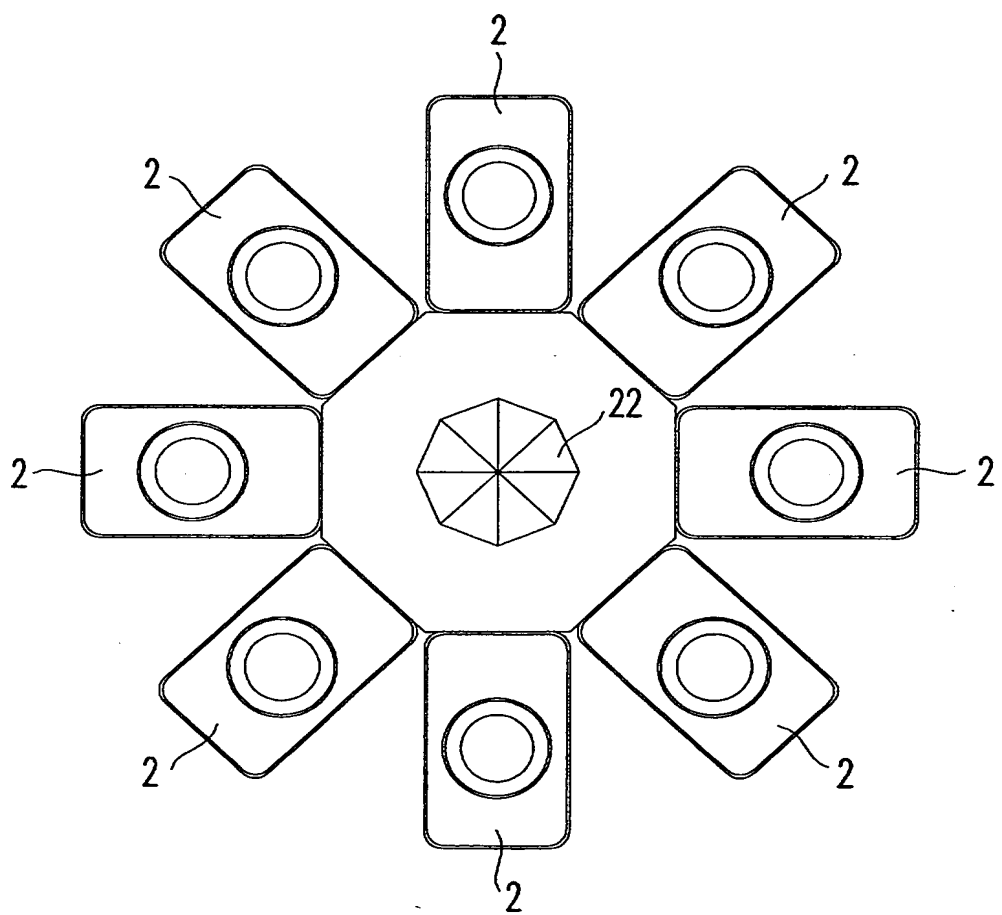


Fig.8

